

Isolation of *Helicobacter pylori* from femoral or iliac atherosclerotic plaques

Izolacja pałeczki *Helicobacter pylori* z blaszki miażdżycowej występującej w tętnicy udowej lub biodrowej

Anna Kędzia¹, Marek Ciecierski², Maria Wierzbowska¹, Andrzej Kufel², Ewa Kwapisz¹

¹Laboratory of Oral Cavity Microbiology, Department of Microbiology, Medical University of Gdańsk (Zakład Mikrobiologii Jamy Ustnej, Katedra Mikrobiologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego)

²Department of Vascular Surgery, Mikołaj Kopernik Regional Traumatology Centre, Gdańsk (Oddział Chirurgii Naczyniowej, Pomorskie Centrum Traumatologii im. Mikołaja Kopernika w Gdańsku)

Abstract

Background. Studies on the aetiology of atherosclerosis suggest the existence of a relationship between inflammatory reaction and the evolution of plaques. These have focused on, among others, viral and bacterial infections, including *Helicobacter pylori*. The presence of these rod-like bacteria was discovered with the aid of DNA investigation, using PCR. However, few authors could prove presence of viable *Helicobacter pylori* in plaques with the aid of bacterial cultures. The aim of this study was to isolate *Helicobacter pylori* rods from atherosclerotic plaques harvested from femoral or iliac arteries, and an evaluation of the susceptibility of the cultured strains to antibiotics.

Materials and methods. Atherosclerotic plaques were harvested intraoperatively from 51 patients (from the femoral artery in 31 cases and from the iliac artery in 20 cases). The samples were cultured in the relevant media and incubated under microaerophilic conditions for 4–7 days at 37°C. Bacterial strains were then identified based on their morphological and biochemical features. The susceptibility of the cultured strains to antibiotics (doxycycline, clarithromycin, amoxicillin, and metronidazole) was also evaluated.

Results. *Helicobacter pylori* rods were successfully isolated from 6.4% of atherosclerotic plaques from femoral arteries and from 5.0% of samples from iliac arteries. All strains were susceptible to doxycycline and clarithromycin but were resistant to metronidazole.

Conclusions. 1. *Helicobacter pylori* rods remain viable in atherosclerotic plaques, which enables successful culturing on special media under microaerophilic conditions. 2. The incidence of *Helicobacter pylori* strains in atherosclerotic plaques from patients operated on because of lower limb ischaemia was as follows: 6.4% of patients had bacteria in plaques from femoral arteries, and 5% tested positive in plaques from iliac arteries. 3. The cultured *Helicobacter pylori* strains were resistant to metronidazole but were susceptible to doxycycline, clarithromycin, and amoxicillin.

Key words: atherosclerotic plaque, femoral artery, iliac artery, *Helicobacter pylori*, susceptibility, antibiotics, isolation

Streszczenie

Wstęp. Badania nad etiologią miażdżycy wskazują na powiązanie procesów zapalnych z ewolucją blaszki miażdżycowej. Objęły one także zakażenia wywołane przez wirusy i bakterie, w tym *Helicobacter pylori*. Obecność tych pałeczek w blaszkach miażdżycowych wykrywano na podstawie obecności DNA metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Niewielu autorów wykazało występowanie w blaszkach żywych form

Address for correspondence:

Dr med. Marek Ciecierski

Oddział Chirurgii Naczyniowej, Pomorskie Centrum Traumatologii im. M. Kopernika

ul. Nowe Ogrody 1–6, 80–803 Gdańsk

e-mail: ciecierski.marek@gmail.com

Helicobacter pylori metodą hodowli. Celem pracy była izolacja pałeczek *Helicobacter pylori* z blaszek miażdżycowych występujących w tętnicy udowej lub biodrowej oraz oznaczenie wrażliwości wyhodowanych szczepów na stosowane antybiotyki.

Materiał i metody. W trakcie zabiegu operacyjnego od 51 pacjentów pobrano blaszki miażdżycowe (31 z tętnicy udowej i 20 z tętnicy biodrowej). Materiały posiewano na odpowiednie podłoża i inkubowano w warunkach mikroaerofilnych przez 4–7 dni w temperaturze 37°C. Szczepy pałeczek identyfikowano na podstawie cech morfologicznych i biochemicznych. Oznaczono wrażliwość wyizolowanych pałeczek na antybiotyki: doksycyklinę, klarytromycynę i amoksyycynę oraz na metronidazol.

Wyniki. Pałeczki *Helicobacter pylori* wyizolowano z 6,4% blaszek występujących w tętnicy udowej i 5,0% z tętnicy biodrowej. Wszystkie szczepy były wrażliwe na doksycyklinę i klarytromycynę, a odporne na metronidazol.

Wnioski. 1. Pałeczki *Helicobacter pylori* w blaszkach miażdżycowych zachowują swoją żywotność, co umożliwia ich wyhodowanie na specjalnym podłożu w warunkach mikroaerofilnych. 2. Częstość występowania szczepów *Helicobacter pylori* w blaszkach miażdżycowych tętnic udowych i biodrowych u chorych operowanych z powodu niedokrwienia kończyn dolnych wynosi 6,4% w blaszkach tętnicy udowej i 5% w tętnicy biodrowej. 3. Wykazano, że wyhodowane szczepy *Helicobacter pylori* są odporne na metronidazol, natomiast stwierdzono ich wrażliwość na doksycyklinę, klarytromycynę i amoksyycynę.

Słowa kluczowe: blaszka miażdżycowa, tętnica udowa, tętnica biodrowa, *Helicobacter pylori*, wrażliwość, antybiotyk, izolacja

Acta Angiol 2010; 16, 3: 129–134

Introduction

Atherosclerosis of the blood vessels is a common cause of death in developed countries, leading to over 50% all deceases noted there. Until now, studies of the disease have failed to disclose all the causative factors of atherosclerosis. The commonly known risk factors include arterial hypertension, tobacco smoking, hyperlipidaemia, excessive body weight, low physical activity, male sex, diabetes, and genetic predispositions [1–3]. Initiation of atherosclerotic plaque development is related to vascular endothelial lesions, which may be due to increased lipidemia (high LDL), noxious effect of tobacco smoke, formation of immune complexes, or the presence of infectious agents [3–6]. The progression of atherosclerosis and the evolution of plaques were found to be correlated with inflammatory processes. It should be noted that breakage of some atherosclerotic plaques can be caused by microbe-induced inflammation [5, 6]. Infections are supposed not only to initiate inflammatory reactions in vascular atherosclerotic plaques but also to sustain and promote their evolution, leading to plaque destabilization [5–9]. Clinical, *in vitro* and animal studies have revealed the presence of various pathogens in atherosclerotic plaques and lesions, including *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, cytomegalovirus (CMV), *Herpes simplex* (HSV), and *Coxsackie B* [9, 10, 13–21]. In most cases, the microorganisms were discovered with the aid of serological tests or molecular techniques (polymerase chain reaction, PCR) [17–20, 22, 23, 25–32].

Wstęp

Choroba miażdżycowa naczyń często jest przyczyną zgonów w krajach uprzemysłowionych. Pomimo stałego postępu zarówno farmakoterapii, jak i chirurgii schorzenie to jest przyczyną ponad 50% wszystkich zgonów w tych krajach. W dotychczas prowadzonych badaniach nad miażdżycą nie ustalono wszystkich czynników odpowiedzialnych za rozwój tej choroby. Wiadomo, że do czynników ryzyka miażdżycy należą: nadciśnienie tętnicze, palenie tytoniu, hiperlipidemia, nadwaga, niewielka aktywność fizyczna, płeć męska, wiek, cukrzyca oraz obciążenia dziedziczne [1–3]. Do zapoczątkowania miażdżycy przyczynia się uszkodzenie śródbłonna naczyń, które może być związane na przykład ze zwiększeniem stężenia lipidów (LDL), działaniem drażniącym składników dymu tytoniowego, oddziaływaniem kompleksów immunologicznych lub czynników infekcyjnych [3–6]. Z badań wynika, że rozwój miażdżycy wiąże się z procesami zapalnymi i ewolucją blaszki miażdżycowej. Zwraca się uwagę na fakt, że przyczyną pęknięcia niektórych blaszek miażdżycowych może być proces zapalny spowodowany przez drobnoustroje [5, 6]. Przypuszcza się też, że infekcja może być zarówno czynnikiem rozpoczynającym, jak i podtrzymującym reakcję zapalną naczyń doprowadzającym do destabilizacji blaszki miażdżycowej [5–9]. Wyniki przeprowadzonych badań klinicznych oraz *in vitro* i na zwierzętach wskazują na obecność w blaszce miażdżycowej i w zmianach miażdżycowych różnych drobnoustrojów, w tym *Chla-*

Few authors successfully cultured *Helicobacter pylori*, which not only proved presence of viable bacteria in plaques but also permitted evaluation of their susceptibility to antibiotics currently used in therapy.

Helicobacter pylori are spiral rod-like Gram-negative ciliated bacteria, which can be cultured under micro-aerophilic conditions; however, culturing them from clinical samples is laborious. Bacteria produce numerous enzymes and toxic agents, including oxidase, urease, alkaline phosphatase, esterase, and peroxide dismutase. Proteins located on microorganism cell surfaces play an important role in *Helicobacter pylori* morbidity. These proteins act as adhesins and enable microorganism adhesion to endothelial cells. Some strains produce cytotoxin coded by the *vacA* gene, which induces endothelial cell vacuolisation *in vitro* but can also be observed *in vivo*. Cytotoxic strains are more often isolated from patients with gastric ulcer disease than from patients suffering from chronic gastritis [24]. Apart from cytotoxin, most *Helicobacter pylori* strains also produce CagA protein. These were proven to induce gastric and duodenal ulcers more often than CagA-negative ones. Strains of *H. pylori* colonize gastric and duodenal mucosa thanks to urease, which neutralizes the environment and protects bacteria against acid. Furthermore, bacterial catalase and peroxide dismutase inactivate bactericidal agents produced by host phagocytes. Apart from a causative role in gastric and duodenal ulcer disease, *Helicobacter pylori* has also been related to coronary heart disease, ischaemic heart disease, vascular diseases, and atherosclerosis morbidity [5, 6, 17, 18, 21, 23, 25, 26, 29, 32].

The aim of this study was to isolate *Helicobacter pylori* from atherosclerotic plaques harvested from femoral and iliac arteries as well as to evaluate the susceptibility of the cultured strains to antibiotics commonly used in therapy.

Material and methods

Atherosclerotic plaques were harvested under aseptic conditions from 51 patients operated on because of atherosclerosis-induced obliteration of the common femoral artery (31 samples) or external iliac artery (20 samples). The study group included patients aged 54–76 years (mean age: 62 years), including 41 men and 10 women. The patients had intermittent claudication grade II–III according to Fontaine (with no necrotic lesions detectable on lower limbs) and underwent surgical procedures of patency restoration in the femoral or iliac arteries or by-passing (aortofemoral or femoropopliteal by-passes). Samples from arteries were harvested under aseptic conditions during operations, placed in containers with transport medium, and then delivered within

mydia pneumoniae, *Helicobacter pylori*, wirusów cytomegalii (CMV), *Herpes simplex* (HSV) i *Coxsackie B* [9, 10, 13–21]. Do wykrywania mikroorganizmów najczęściej wykorzystywano metody serologiczne lub technikę molekularną: łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) [17–20, 22, 23, 25–32].

Niewielu autorów udowodniło występowanie *Helicobacter pylori* metodą hodowli, która nie tylko potwierdza występowanie w blaszce miażdżycowej żywych bakterii, ale jednocześnie umożliwia oznaczanie ich wrażliwości na antybiotyki aktualnie stosowane w terapii.

Pałeczki *Helicobacter pylori* są Gram-ujemne, kształtu spiralnego. Ich komórki posiadają rzęski. Rosną w warunkach mikroaerofilnych. Wyhodowanie ich z materiałów klinicznych jest trudne. Bakterie te wytwarzają wiele enzymów i czynników toksycznych, wśród których wymienia się: oksydazę, ureazę, alkaliczną fosfatazę, esterazę oraz dysmutazę nadtlenkową. Ważną funkcję w chorobotwórczości pałeczek *Helicobacter pylori* pełnią białka zlokalizowane na powierzchni komórek, które odgrywają rolę adhezyn umożliwiających przyleganie bakterii do komórek nabłonka. Niektóre szczepy wytwarzają cytotoksynę kodowaną przez gen *vacA* odpowiedzialną za wakuolizację komórek nabłonkowych w warunkach *in vitro*. Efekt ten obserwuje się również w warunkach *in vivo*. Wykazano, że szczepy cytotoksyczne częściej są obecne u pacjentów z chorobą wrzodową żołądka niż u chorych z przewlekłym zapaleniem błony śluzowej [24]. Większość szczepów *Helicobacter pylori* poza cytotoksyną zawiera też białko CagA. Stwierdzono, że właśnie takie szczepy częściej powodują wrzody żołądka i dwunastnicy niż szczepy niewytwarzające białka. Szczepy *Helicobacter pylori* kolonizują błonę śluzową żołądka i dwunastnicy dzięki wytwarzaniu ureazy, która zobojętnia środowisko i ochrania bakterie przed działaniem kwasu. Ponadto produkowane przez pałeczki katalaza i dysmutaza nadtlenkowa unieczynnają substancje bakteriobójcze produkowane przez komórki fagocytów. Poza powodowaniem wrzodów żołądka i dwunastnicy pałeczki *Helicobacter pylori* są związane z chorobą wieńcową serca, chorobą niedokrwienną serca, chorobami naczyń, miażdżycą tętnic [5, 6, 17, 18, 21, 23, 25, 26, 29, 32].

Celem pracy była izolacja pałeczek *Helicobacter pylori* z blaszek miażdżycowych występujących w tętnicy udowej lub biodrowej oraz oznaczenie wrażliwości wyhodowanych szczepów na częściej stosowane w leczeniu antybiotyki.

Materiał i metody badań

Blaszki miażdżycowe pobrano aseptycznie od 51 pacjentów operowanych z powodu niedrożności miaż-

one hour to the laboratory. Materials were homogenized in an eccentric blender, and samples were seeded on Columbia agar supplemented with 5% defibrinated sheep blood and *Pylori* agar. Cultures were incubated for 4–7 days in anaerostats at 37°C under microaerophilic conditions (Campy Pak Plus, Becton Dickinson). *Helicobacter pylori* rods were then identified based on typical colony morphology, cell appearance in Gram-stained preparations, and biochemical features evaluated by the API Campy test (bio Merieux), which included production of oxidase, catalase, urease, and other proteins. Investigations were performed according to the manufacturers' suggestions. Susceptibility to antibiotics was evaluated using E-test kits (AB Biodisk), including doxycycline, amoxicillin, clarithromycin, and metronidazole.

Results

Helicobacter pylori were cultured in three of the investigated samples (5.8%). These were obtained from two plaques (6.4%) from the femoral artery and one plaque (5.0%) from the iliac artery. All strains were susceptible to doxycycline and clarithromycin, one strain was resistant to amoxicillin, but all were resistant to metronidazole.

Discussion

The role of infectious agents in the pathogenesis of atherosclerosis was discovered in the 1970s. Studies were initiated by Fabricant et al. [13], who infected chickens with avian herpes virus (Marek's disease virus, MDV) and noticed vascular lesions similar to the ones described in humans affected by atherosclerosis. Other reports pointed out that some infectious agents (*Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, cytomegalovirus, or herpes zoster virus) may also play a role in the pathogenesis of coronary heart disease, brain vascular diseases, or vessel atherosclerosis [6, 9, 17, 20, 23, 25, 26, 29]. Furthermore, correlation of *Helicobacter pylori* infection with increased serum triglycerides was observed, with triglycerides contributing to atherosclerosis progression [30]. Potent chronic immunological reactions in the form of humoral response to *Helicobacter pylori* infection were also suggested to participate in the formation of atherosclerotic lesions [31]. The presence of *Helicobacter pylori* in atherosclerotic plaques was described in only a few reports, [17, 18, 20, 23, 29] where pathogens were detected with PCR; however, our study was based on *Helicobacter pylori* cultures. Farsak et al. [17] identified *Helicobacter pylori* in coronary arteries in 37% of tested samples. With the aid of PCR, Ameriso et al. [23] found bacteria in 53% of the analyzed atherosclerotic plaques removed from carotid arteries. Kowalski et al.

dziłkowej tętnicy udowej wspólnej (31 materiałów) lub biodrowej zewnętrznej (20 materiałów). Zabiegowi poddano chorych w wieku 54–76 lat (średnia wieku wynosiła 62 lata), w tym 41 mężczyzn i 10 kobiet, z chromaniem przestankowym w II i III stopniu w skali Fontaine'a (czyli bez zmian martwiczych w obrębie kończyn), leczonych operacyjnie metodą udroźnienia tętnicy udowej lub biodrowej bądź przez wszczepienie pomostu omijającego (aortalno-udowego lub udowo-podkolanowego). Wycinki tętnic pobierano aseptycznie w czasie zabiegu operacyjnego i umieszczano w pojemniku z płynem transportowym, który w czasie 1 godziny dostarczano do laboratorium. Po homogenizacji materiału (mieszalnik mimośrodowy) próbkę posiewano na podłoże *Columbia agar* z dodatkiem 5-procentowej odwłóknionej krwi baraniej oraz *Pylori agar*. Posiewy hodowano w anaerostatach w warunkach mikroaerofilnych (Campy Pak Plus, Becton Dickinson) w temperaturze 37°C przez 4–7 dni. Pałeczki *Helicobacter pylori* identyfikowano na podstawie typowej morfologii kolonii, wyglądu komórek w preparacie barwionym metodą Grama oraz cech biochemicznych oznaczanych testem API Campy (bio Merieux), które obejmowały między innymi wytwarzanie oksydazy, katalazy, ureazy i inne. Ocenę przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta. Do oceny wrażliwości wyizolowanych szczepów *Helicobacter pylori* na antybiotyki, czyli doksycyklinę, amoksycylinę, klarytromycynę oraz metronidazol, wykorzystano zestawy E-test (AB Biodisk).

Wyniki

Uzyskane wyniki wskazują, że pałeczki *Helicobacter pylori* występowały w 3 (5,8%) spośród wszystkich badanych materiałów. Wyizolowano je z 2 (6,4%) blaszek miażdżycowych usytuowanych w tętnicy udowej i z 1 (5,0%) blaszki miażdżycowej umiejscowionej w tętnicy biodrowej. Wszystkie szczepy wykazały wrażliwość na doksycyklinę i klarytromycynę. Natomiast jeden szczep był oporny na amoksycylinę, a wszystkie okazały się oporne na metronidazol.

Omówienie

Na znaczenie czynników infekcyjnych w rozwoju zmian miażdżycowych tętnic zwrócono uwagę w latach 70. XX wieku. Przyczyniły się do tego badania przeprowadzone przez Fabricanta i wsp. [13], w których kurczęta zakażano wirusem ptasiej opryszczki. Autorzy w naczyniach krwionośnych tych ptaków zaobserwowali zmiany podobne do obecnych u ludzi chorych na miażdżycę. Wyniki doświadczeń wskazują też, że niektóre drobnoustroje, takie jak *Chlamydia*

[32] used molecular methods to detect *Helicobacter pylori* DNA in 22 (47.8%) analyzed plaques, whereas Pinar et al. [18] demonstrated *Helicobacter pylori* presence in 14 (42.4%) among 33 plaque specimens. Further studies by Ameriso et al. [29] resulted in PCR detection of bacterial DNA in 28 (58%) among 48 tested plaques, whereas Kaplan et al. [20] detected bacteria in only 17.3% of cases. The incidence of *Helicobacter pylori* in the presented study was even lower than that (5.8%). Other authors, however, could not detect *Helicobacter pylori* strains in atherosclerotic plaques using PCR [9, 19, 22].

Conclusions

1. *Helicobacter pylori* rods remain viable in atherosclerotic plaques, which permits culturing them under microaerophilic conditions on a special medium.
2. Incidence of the presence of *Helicobacter pylori* strains in atherosclerotic plaques in patients operated on because of lower limb ischaemia was 6.4% in femoral arteries and 5% in plaques from iliac arteries.
3. The cultured *Helicobacter pylori* strains were resistant to metronidazole but susceptible to doxycycline, clarithromycin, and amoxicillin.
4. It remains to be seen if antibiotic therapy can influence the clinical course of lower limb atherosclerosis.

References

1. Schneiderman N (1987) Psychophysiologic factors in atherogenesis and coronary artery disease. *Circulation*, 76 (suppl 1): 41–46.
2. Thom DH, Grayston JT, Siscovick DS, Wang S, Daling JR (1992) Association of prior infection with *Chlamydia pneumoniae* and angiographically coronary disease. *JAMA*, 268: 68–73.
3. Rajtar R, Kloch M, Bober M, Kolańska-Kloch W (2006) Aktualne spojrzenie na zapalne, biochemiczne i hemostatyczne markery oraz czynniki ryzyka choroby niedokrwiennej serca. *Przegl Lek*, 63: 767–772.
4. Fuster V, Badimon L, Chesebro JH (1992) The pathogenesis of coronary artery disease and the acute syndromes. *N Engl J Med*, 362: 142–247.
5. Bochniak M, Sadlak-Nowicka J (2004) Zapalenie przyzębia a choroby układu sercowo-naczyniowego — przegląd piśmiennictwa. *Przegl Lek*, 61: 518–522.
6. Czech B, Kuciewicz E, Pawlak S (2004) Rola procesów zapalnych i mikroorganizmów w etiopatogenezie miażdżycy — przegląd literatury. *Wiad Lek*, 57: 659–662.
7. Grayston JT (1993) *Chlamydia* in atherosclerosis. *Circulation*, 87: 1408–1412.
8. Ross R. (1999) Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340: 115–126.
9. Zegarski W, Szymaniak L, Grabowska E, Krause A. (2004) Badania nad rolą *Helicobacter pylori* i *Chlamydia pneumoniae* w tętniakach aorty oraz w miażdżycy aorty i tętnic

pneumoniae, *Helicobacter pylori*, wirus cytomegalii lub wirus opryszczki, mogą uczestniczyć w patogenezie choroby wieńcowej, chorób naczyniowych mózgu i miażdżycy naczyń [6, 9, 17, 20, 23, 25, 26, 29]. Zwrócono także uwagę na korelację infekcji wywołanej przez *Helicobacter pylori* ze zwiększeniem stężenia triglicerydów w surowicy krwi, które przyczyniają się do miażdżycy [30]. Sugeruje się, że nasilone przewlekłe reakcje immunologiczne odpowiedzi humoralnej na infekcję *Helicobacter pylori* mogą odgrywać rolę w powstawaniu zmian miażdżycowych [31]. Obecność pałeczek *Helicobacter pylori* w blaszkach miażdżycowych opisano w nielicznych publikacjach [17, 18, 20, 23, 29]. W celu wykrycia drobnoustrojów użyto metody PCR. W niniejszych badaniach do wykrycia obecności szczepów *Helicobacter pylori* w blaszkach miażdżycowych wykorzystano metodę hodowli. Farsak i wsp. [17] stwierdzili obecność *Helicobacter pylori* w tętnicy wieńcowej w 37% badanych próbek. Ameriso i wsp. [23] metodą PCR wykazali obecność tych pałeczek w 53% ocenianych blaszek miażdżycowych usuniętych z tętnic szyjnych. Kowalski i wsp. [32] metodą molekularną wykryli obecność DNA *Helicobacter pylori* w 22 (47,8%) blaszkach miażdżycowych. Pinar i wsp. [18] wykazali obecność *Helicobacter pylori* w 14 (42,4%) spośród 33 ocenianych blaszek miażdżycowych. W kolejnych badaniach Ameriso i wsp. [29], stosując metodę PCR, wykryli obecność pałeczek w 28 (58%) spośród 48 badanych blaszek miażdżycowych, a Kaplan i wsp. [20] odnotowali mniejszy odsetek — 17,3%. W niniejszych badaniach odsetek pałeczek *Helicobacter pylori* był jeszcze mniejszy (5,8%). Niektórzy autorzy nie wykazali obecności szczepów *Helicobacter pylori* w blaszkach miażdżycowych, stosując metodę PCR [9, 19, 22].

Wnioski

1. Pałeczki *Helicobacter pylori* w blaszkach miażdżycowych zachowują swoją żywotność, co umożliwia ich wyhodowanie na specjalnym podłożu w warunkach mikroaerofilnych.
2. Częstość występowania szczepów *Helicobacter pylori* w blaszkach miażdżycowych tętnic udowych i biodrowych u chorych operowanych z powodu niedokrwienia kończyn dolnych wynosi 6,4% w blaszkach tętnicy udowej i 5% w tętnicy biodrowej.
3. Stwierdzono oporność wyhodowanych szczepów *Helicobacter pylori* na metronidazol. Były one natomiast wrażliwe na doksycyklinę, klaromycynę i amoksycylinę.
4. Dalszych badań wymaga odpowiedź na pytanie, czy leczenie antybiotykami może mieć wpływ na przebieg kliniczny miażdżycy tętnic kończyn dolnych.

- biodrowych. Post Med Klin Wojsk, 9: 14–18.
10. Nieto FJ, Adam E, Sorlie P, Sore P, Orle P (1996) Cohort study of cytomegalovirus infection as a risk factor for carotid intimalmedial thickening, a measure of subclinical atherosclerosis. Circulation, 94: 922–927.
11. Hendrix MGR, Dromans PHJ, Kislair P, Bosman F, Brugge-man CA (1989) The presence of cytomegalovirus nucleic acid in arterial walls of atherosclerotic and nonatherosclerotic patients. Am J Pathol, 134: 1151–1157.
12. Patel P, Mendak MA, Carrington D et al (1995) Association of *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumonia* infections with coronary heart disease and cardiovascular risk factors. Br Med J, 311: 711–714.
13. Fabricant CG, Fabricant J, Litrenta MM, Minick CR (1978) Virus-induced atherosclerosis. J Exp Med, 148: 335–340.
14. Moazed TC, Kuo CC, Grayston JT, Campbell LA (1997) Murine models of *Chlamydia pneumonia* infection and atherosclerosis. J Infect Dis, 175: 883–889.
15. Zhu JH, Quymy AA, Norman JE et al (2000) Effect of total pathogen burden on coronary artery disease risk and C-creative protein levels. Am J Cardiol, 85: 140–146.
16. Virella G, Lopes-Virella MF (1987) Infections and atherosclerosis. Transplant Proc, 19 (suppl 5): 26–29.
17. Farsak B, Yildirir A, Akyon Y et al (2000) Detection of *Chlamydia pneumonia* and *Helicobacter pylori* DNA in human atherosclerotic plaques by PCR. J Clin Microbiol, 38: 4408–4411.
18. Pinar A, Oc M, Farsak B et al (2004) The presence of *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* and cytomegalovirus in human atherosclerosis detect by molecular and serological methods. Microbiol Bul, 38: 213–222.
19. Sulewska A., Modrzejewski W., Kovalchuk O et al (2004) Attempts to detect *Helicobacter pylori* in atherosclerotic plaques. Ann Acad Med. Bialostocensis, 49 (suppl 1: Proceedings): 239–241.
20. Kaplan M, Yavuz SS, Cinar B et al (2006) Detection of *Chlamydia pneumonia* and *Helicobacter pylori* in atherosclerotic plaques of carotid artery by polymerase chain reaction. Int J Infect Dis, 10: 116–123.
21. Mayr M, Kiechi S, Willeit J, Wick G, Xu Q (2000) Infections, immunity and atherosclerosis association of antibodies to *Chlamydia pneumonia*, *Helicobacter pylori*, and Cytomegalovirus with immune reactions to heat shock protein 60 and carotid or femoral atherosclerosis. Circulation, 102: 833–839.
22. Kaklikkaya I, Kaklikkaya N, Burak K et al (2006) Investigation of *Chlamydia pneumoniae* DNA, chlamydial lipopolisaccharide antigens, and *Helicobacter pylori* DNA in atherosclerotic plaques with aortoiliac occlusive disease. Cardiovasc Pathol, 15: 105–109.
23. Ameriso SF, Fridman EA, Leiguarda RC, Sevlever GE (2001) Detection of *Helicobacter pylori* in human carotid atherosclerotic plaques. Stroke, 32: 385–391.
24. Blaser MJ (1996) Role of vac A and cag A locus of *Helicobacter pylori* in human disease. Alim Pharmacol Ther, 10 (suppl. 1): 73–77.
25. Roblin PM, Doumornay W, Hammerschlang MR (1992) Use of Hep-2 cells for improved isolation and passage of *Chlamydia pneumonia*. J Clin Microbiol, 30: 1968–1972.
26. Banach M, Markuszewski L, Zaslonka J, Grzegorzczak J, Okoński P, Jegier B (2004) Rola zakażeń w patogenezie miażdżycy. Przegl Epidemiol, 58: 671–626.
27. Loehe F, Brittmann I, Weilbach C, Lauterjung L, Schildberg FW, Heiss MM (2002) *Chlamydia pneumonia* in atherosclerotic lesions of patients undergoing vascular surgery. Ann Vasc Surg, 16: 467–473.
28. Ong G, Thomas BJ, Mansfield AO, Davidson BR, Taylor-Robinson D (1996) Detection and widespread distribution of *Chlamydia pneumonia* in the vascular system and its implications. J Clin Pathol, 49: 102–106.
29. Ameriso SF, Villamil AR, Zedda C et al (2005) Heme oxydase-I is expressed in carotid atherosclerotic plaques infected by *Helicobacter pylori* and is more prevalent in asymptomatic subjects. Stroke, 36: 1896–1990.
30. Niemela S, Karttunen T, Korhonen T et al (1996) Could *Helicobacter pylori* infection increase the risk of coronary heart disease by modifying serum lipid concentrations? Heart, 75: 573–575.
31. Konturek SJ, Konturek PC, Pieniazek P, Bielański W (1999) Role of *Helicobacter pylori* infection in extragastrointestinal disorders. Introductory remarks. J Physiol Pharmacol, 50: 683–694.
32. Kowalski M, Rees W, Konturek PC et al (2002) Detection of *Helicobacter pylori* specific DNA in human atheromatous coronary arteries and its association to prior myocardial infarction and unstable angina. Diag Liver Dig, 34: 398–402.